

***Lasiodiplodia theobromae* agente causal de muerte descendente en guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México**

Descending death in soursop (*Annona muricata* L.) caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Nayarit, Mexico

Betancourt Aranguré, A. ¹, Luna Esquivel, G. ^{1,2}, Ríos Velasco, C. ³,
López Guzmán, G. G. ^{1,2}, Cambero Campos, J. O. ^{1,2}, Cruz-Crespo, E. ^{1,2}

¹ M. C. Programa de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias. Universidad Autónoma de Nayarit. Km. 9 Carretera Tepic – Compostela. Xalisco, Nayarit, México.

² Dr.Sc. Unidad Académica de Agricultura. Universidad Autónoma de Nayarit. Km. 9 Carretera Tepic – Compostela. Xalisco Nayarit, México.

³ Dr. Sc. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Unidad Cuauhtémoc. Av. Río Conchos, S/N, Parque Industrial, Apdo. Postal 781 C.P. 31570, Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, México.



Please cite this article as/Como citar este artículo: Betancourt Aranguré, A., Luna Esquivel, G., Ríos Velasco, C., López Guzmán, G. G., Cambero Campos, J. O., Cruz-Crespo, E. (2024). Descending death in soursop (*Annona muricata* L.) caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Nayarit, Mexico. *Revista Bio Ciencias*, 11, e1594. <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1594>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: October 22th 2023.

Accepted/Aceptado: February 15th 2024.

Available on line/Publicado: March 08th 2024.

RESUMEN

El estudio consistió en identificar el agente causal de la muerte descendente de ramas en guanábana en los municipios de Compostela y San Blas, Nayarit, México. *Lasiodiplodia* es un patógeno poco estudiado respecto a su patogenicidad y hospederos en México; lo cual reafirma la necesidad de conducir estudios que involucren caracteres morfológicos y genéticos de *Lasiodiplodia*, especialmente por la asociación de un complejo de especies crípticas. De los tejidos de guanábana con síntomas aparentes de muerte descendente se obtuvieron 9 aislamientos con caracteres morfológicos macro y microscópicos típicos de *Lasiodiplodia*. Los cebadores universales ITS4 e ITS5 permitieron la identidad molecular de especies de *Lasiodiplodia*, *L. theobromae* (6 aislamientos), *L. pseudotheobromae* (1 aislamiento), *L. venezuelensis* (1 aislamiento) y *L. iranensis* (1 aislamiento). Se corroboró la patogenicidad del aislamiento de *L. theobromae* (4To2), primer reporte para México en el cultivo de guanábana, confirmado mediante técnicas moleculares, del cual se corroboró su identidad con la secuenciación de TEF1a utilizando los cebadores EF-728F y EF-986R, el aislado indujo marchitamiento de hojas, muerte de ramas y lesiones necróticas en los ápices vegetativos.

PALABRAS CLAVE: Patógeno, ápices, ramas, tejido necrótico, regresiva.

***Corresponding Author:**

Gregorio Luna-Esquivel. Unidad Académica de Agricultura. Universidad Autónoma de Nayarit. Km. 9 Carretera Tepic – Compostela. Xalisco Nayarit, México. Teléfono: (311) 184 8153. E-mail: gollole@hotmail.com

ABSTRACT

The study consisted of identifying the causal agent of branch dieback in soursop in the municipalities of Compostela and San Blas, Nayarit, Mexico. *Lasiodiplodia* is a poorly studied pathogen regarding its pathogenicity and hosts in Mexico, reaffirming the need for studies involving morphological and genetic characteristics of *Lasiodiplodia*, especially due to the association with a complex of cryptic species. From the tissues of soursop showing apparent symptoms of dieback, 9 isolates were obtained with morphological macro and microscopic characteristics typical of *Lasiodiplodia*. Universal primers ITS4 and ITS5 allowed the molecular identification of *Lasiodiplodia* species, including *L. theobromae* (6 isolates), *L. pseudotheobromae* (1 isolate), *L. venezuelensis* (1 isolate), and *L. iranensis* (1 isolate). The pathogenicity of the *L. theobromae* isolate (4To2) was confirmed, marking the first report in Mexico for soursop cultivation, confirmed through molecular techniques. Its identity was corroborated by sequencing TEF1a using primers EF-728F and EF-986R. The isolated strain induced leaf wilting, branch death, and necrotic lesions in vegetative apices.

KEY WORDS : Pathogen, apices, branches, necrotic tissue, regressive.

Introducción

La guanábana (*Annona muricata* L.) (Magnoliales: Annonaceae), es la especie de anonáceas más extensamente cultivada en México, actualmente se registran 3,378.5 ha con un rendimiento promedio de 10.4 ton ha⁻¹ (SIAP, 2023). En Nayarit se concentra el 72.9 % de la producción nacional correspondiente a una producción cercana a 35,000 ton (SIAP, 2023). La guanábana presenta problemas fitosanitarios de importancia económica destacando las enfermedades, especialmente fúngicas. En México, se han reportado antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* y pudrición blanda de frutos por *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (Cambero-Ayón *et al.*, 2019). En el caso de muerte descendente en guanábana, particularmente en Nayarit (México), el hongo que se ha reportado asociado es *L. theobromae* en asociación con insectos xilófagos, pero no se reportan pruebas de patogenicidad (Hernández *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2018). Las especies pertenecientes al género *Lasiodiplodia* afectan a más de 500 especies de plantas, especialmente frutales tropicales y subtropicales de importancia económica (Punithalingam, 1980; Alves *et al.*, 2008; Picos-Muñoz *et al.*, 2015), los daños incluyen diferentes síntomas como pudriciones, cánceres y muerte de ramas; pero son considerados patógenos débiles porque requieren que el hospedante este estresado (p.e. deficiencia nutrimental) y presente heridas causadas por plagas (insectos o ácaros) o mecánicas (Gonçalves *et al.*, 2016). Los primeros síntomas de muerte descendente en ramas se presentan en los ápices, los cuales

se empiezan a marchitar; las hojas se tornan cafés y mueren. Subsecuentemente, las hojas caen y la rama muestra una apariencia seca. En los casos más severos, las ramas de todo el árbol se secan sucesivamente. *L. theobromae* es considerada la especie más virulenta ( rbez & Gubler, 2009) y su severidad varía de 8 a 100 % (Nam et al., 2016). Algunos síntomas asociados a *L. theobromae* es la presencia de exudados de color café oscuro a negro en la corteza y, tejido necrótico en el interior de troncos y ramas, especialmente del sistema vascular se evidencia una decoloración similar a una estría de color café oscuro, en forma descendente (Hernández et al., 2013). En aguacate (*Persea americana*) en Perú se reportó a *L. theobromae* causando necrosis en la corteza de los árboles (Leon & Mattos, 2016). En macadamia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche) en Brasil, *L. theobromae* causa necrosis del ápice, pudrición de pedúnculo y muerte descendente (Fischer et al., 2017). En Nayarit, México *L. theobromae* causa pudrición blanda en frutos de yaca (*Artocarpus heterophyllus*) (Medina et al., 2018). En mango (*Mangifera indica*), mamey (*Pouteria sapota*), vid (*Vitis vinifera*) y lima 'Persa' (*Citrus x latifolia*) en México, se ha reportado a *L. citricola* y *L. pseudotheobromae* como agentes causales de pudrición de pedúnculo, cánceres en tallos y muerte descendente ( rbez & Gubler, 2009; Sandoval-Sánchez et al., 2013; Tovar et al., 2013; Valle de la Paz et al., 2019). Cambero-Ay n et al. (2019) reportaron pudrición de frutos en guanábana causados por *L. pseudotheobromae*. *Lasiodiplodia* es un patógeno poco estudiado en México respecto a su patogenicidad, virulencia y rango de hospederos. Basado en lo anterior, el objetivo del estudio fue identificar morfológica y molecularmente el agente causal de muerte descendente en guanábana.

Material y Métodos

Recolección de muestras

Se realizaron muestreos quincenales durante los periodos secos (marzo, abril y mayo) y lluviosos (agosto, septiembre y octubre) de 2020 en nueve huertos con árboles a pie franco de 4 a 7 años en las zonas productoras de Nayarit, México (Tabla 1). Se recolectaron muestras de tejido de ramas con síntomas de muerte descendente en cinco árboles de cada huerto. Los tejidos se depositaron en bolsas de papel Kraft y se trasladaron al laboratorio de Parasitología Agrícola en el CEMIC 03 de la Universidad Autónoma de Nayarit, donde fueron procesados.

Tabla 1. Ubicación de huertos de guanábana muestreados para el aislamiento de *Lasiodiplodia* spp. en Nayarit, México.

Municipio	Ubicación	Coordenadas	Altitud (masl)
Compostela	El Tonino	21° 04' 05" N-105° 12' 51" W	74
Compostela	Divisadero	21° 7' 23.5 " N-105° 11' 14.2" W	36
Compostela	Capomo G	21° 6' 51.7" N-105° 9' 2.9" W	38
Compostela	Divisadero2	21° 7' 33.9" N-105° 12' 9.3" W	39
Compostela	Chacala	21° 9' 26.9" N-105° 12' 9.6" W	43
San Blas	Tecuitata 1	21° 27' 35.6 N-105° 9' 21.4" W	367
San Blas	La bajada	21° 32' 0" N-105° 10' 26.2" W	222
San Blas	Infiernillo	21° 32' 13.2" N-105° 11' 4.1" W	188
San Blas	Tecuitata 2	21° 27' 39.8" N-105° 9' 11.3" W	379
San Blas	La palma	21° 31' 0.9" N-105° 11' 5.3" W	16

Masl: metros sobre nivel del mar

Aislamiento y purificación

El tejido sintomático (ramas) se lavó con agua destilada estéril (SDW) por 1 min y a partir del avance (zona de transición) de la enfermedad, se seccionaron en trozos de 0.5 cm², se sumergieron por 3 min en hipoclorito de sodio al 3 %, luego se enjuagaron tres veces consecutivas con SDW por 3 min y se secaron con toallitas de papel estériles. En seguida, los trozos del tejido enfermo se colocaron directamente sobre el medio del cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) contenido en placas de Petri; se sembraron por duplicado con cinco porciones distribuidas en cada placa. Posteriormente, se sellaron con papel film y se incubaron a 26 ± 2 °C, en ausencia de luz. El crecimiento de los hongos se revisó sistemáticamente cada 24 h (Saldarriaga *et al.*, 2008; Abdollahzadeh *et al.*, 2010). A partir de los aislamientos fúngicos de 7 d de crecimiento se purificaron mediante la técnica de punta de hifa, posteriormente se incrementaron y conservaron en PDA bajo las condiciones de incubación arriba descritas.

Pruebas de patogenicidad

Para determinar la patogenicidad y rango hospedero de los aislados fúngicos, se inocularon árboles (≈1 año de edad) de guanábana, mango, yaca, aguacate y lima 'Persa' aparentemente sanos crecidos y mantenidos en condiciones de malla sombra al 50 %. Debido a la similitud en sus características macro y microscópicas de los 9 aislados de *Lasiodiplodia* obtenidos, se seleccionó uno al azar, este se inoculó en ramas con diámetros de aproximadamente 8 mm y una longitud aproximada de 30 cm, tanto en ramas primarias como secundarias a 30 cm del ápice aproximadamente. El inóculo consistió en explantes (discos de PDA de 5 mm de diámetro) del hongo (micelio y conidios sin cuantificar), crecido por 7 d. El hongo se inoculó directamente sobre

el xilema para lo cual se retir  parte de la corteza de las ramas. El testigo consistió en un disco de PDA de las mismas dimensiones sin el hongo. Posteriormente, la zona del xilema inoculada se cubrió con algodón estéril húmedo y papel film para evitar contaminación externa. Las ramas que mostraron síntomas se separaron de la planta y se llevaron laboratorio de Parasitología Agrícola en el CEMIC 03 de la Universidad Autónoma de Nayarit para su procesamiento, donde se re-aisló el agente causal y se corroboró que correspondiera al hongo inoculado, mediante la observación de micelio aéreo de color gris-negro t pico de *Lasiodiplodia* (Gonçalves et al., 2016). Se utilizó un diseño de bloques completos al azar, donde cada planta se consideró como unidad experimental. El experimento constó de tres repeticiones. Los testigos consistieron en árboles sin inoculaciones del hongo.

Extracción de ADN

A los hongos aislados, se les extrajo el ADN genómico (ADNg) para su análisis de identidad, para este propósito se utilizó el método de extracción de CTAB II, para lo cual, se recolectó el micelio fúngico de 7 d de crecimiento. Se maceró 1 g de la muestra, junto con 700 μ L de CTAB I y se colocó en un microtubo estéril de 2 mL y se procesó de acuerdo con el protocolo de Allers & Lichten (2000). La pastilla de ADNg se re-suspendió en 30 μ L de agua MiliQ y se conserv  a -20  C hasta su uso. La concentración y pureza del ADN se cuantificó en un Nanodrop (JENWAY, Bibby Scientific Ltd, UK ). El ADNg obtenido se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y subsecuentemente, se us  para la reacción con los iniciadores ITS5F (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) / ITS4R (TCCTCCGCTTATTGATATGC) y EF-728F (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) / EF-986R (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990; Casarrubias-Carrillo et al., 2003; Abdollahzadeh et al., 2010).

Identificación morfológica y molecular

Preliminarmente se identificó a *Lasiodiplodia* basado en sus características morfológicas microscópicas y de crecimiento en el medio de cultivo PDA (macroscópicas) con ayuda de las claves taxonómicas de Abdollahzadeh et al. (2010) y Shah et al. (2010). Subsecuentemente, se realizó la identificación molecular a partir del ADNg obtenido con los iniciadores ITS4/ITS5 y EF1-728F/EF1-986R. Las cantidades, concentración final y reactivos utilizados para preparar la mezcla de reacción para un volumen de PCR de 26 μ L fueron los siguientes; 0.9 μ L iniciadores, 13.5 μ L de polimerasa RedTaq, 1.5 μ L de ADNg y 9.2 μ L de SDW. Las condiciones de amplificación para la PCR incluyeron una etapa inicial de desnaturalización a 94  C por 5 min, 38 ciclos de desnaturalización a 94  C por 1 min, alineamiento a 60  C por 1 min, extensión a 72  C por 1 min, y una etapa final de extensión a 72  C por 4 min. Los productos de PCR se visualizaron por medio de electroforesis de geles de agarosa al 1.5 % en tampón TBE 1 X a 80 V por 1 h (White et al., 1990; Casarrubias-Carrillo et al., 2003; Shah et al., 2010). El producto fue secuenciado por Macrogen Genome Center (Seoul, Korea ). La secuencia obtenida se compar  con las bases de datos del NCBI usando el algoritmo de BLAST (Altschul et al., 1990) para verificar el porcentaje de identidad correspondiente a la especie.

Análisis de los patrones de bandas obtenidos

Las secuencias obtenidas con cada iniciador, se editaron y ensamblaron con el software MEGA X. Las secuencias consenso se compararon con la base de datos del GenBank, mediante el programa BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Posteriormente, con secuencias representativas de los géneros y especies pre-identificadas en el análisis BLAST, se realizó un alineamiento en MEGA X. La matriz obtenida fue utilizada para construir un análisis filogenético basado en el método de vecinos cercanos (NJ). El soporte de la topología interna del árbol filogenético se realizó mediante análisis de bootstrap con 1000 repeticiones (Kumar *et al.*, 2018). El árbol de consenso bootstrap inferido a partir de 1000 repeticiones se tomó para representar la historia evolutiva de los taxones analizados. El porcentaje de repeticiones de árboles en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 réplicas) se muestra junto a las ramas (Felsenstein, 1985). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima probabilidad compuesta (Tamura *et al.*, 2004) y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Este análisis involucró 19 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a + 2^a + 3^a + Sin codificación. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 528 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

Resultados y Discusión

Pruebas de patogenicidad

Veintidós días después de la inoculación de las plantas con el hongo, solamente los árboles de guanábana mostraron síntomas aparentes de muerte descendente de ramas y pudrición de ápices (Figura 1A y 1B), desarrolló clorosis, marchitamiento de hojas y posterior muerte de la rama, así como lesiones necróticas en los ápices de las ramas inoculadas. Estas lesiones necróticas presentan desarrollo con tendencia descendente. Las plantas testigo, no mostraron estos síntomas. Polanco *et al.* (2019) reportaron síntomas de necrosis, marchitez y muerte de ramas en dirección descendente en naranjo dulce (*C. sinensis*), así como, lesiones necróticas exteriores de 2 cm, a los 32 d después de haber sido inoculadas con *L. theobromae*. Valle de la Paz *et al.* (2019) reportaron clorosis en hojas, muerte descendente de ramas primarias y secundarias, formación de cánceres y exudados gomosos en plantas de lima 'Persa' a los 22 d después de haber sido inoculadas con cepas de especies de *Lasiodiplodia* (*L. citricola*, *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*). En mamey se confirmó la patogenicidad de *L. theobromae* a los 30 d después de ser inoculada mediante heridas en ramas, evidenciada por la presencia de lesiones necróticas y dos años después se observó la muerte descendente de brotes vegetativos (Vásquez-López *et al.*, 2009).



Figura 1. Apariencia de muerte de ramas en plantas de guanábana a los 22 días después de ser inoculadas con el hongo *Lasiodiplodia* (A). Pudrición de ápice en plantas de guanábana a los 22 días de haber sido inoculadas con *Lasiodiplodia* (B).

Morfología de aislados de *Lasiodiplodia*

Los nueve aislados de *Lasiodiplodia* produjeron micelio a ero abundante, resultando dos tipos, uno de aspecto algodinoso y otro liso, por lo que podría tratarse de dos especies, el micelio de ambos tipos es septado, blanco cuando es joven y se tornó a color negro con el paso de los días (Figura 2A), aproximadamente a los 30 d de crecimiento micelial se evidenció la presencia de picnidios con conidios característicos de *Lasiodiplodia* (Figura 2B). Los conidios son ovoides a elipsoidales, con ápices redondeados, que se estrechan para truncar la base, hialinos y cenocíticos en los cultivos jóvenes, tornándose a café oscuro al envejecer, con un septo, los cuales mostraban estrías longitudinales. Cabe señalar, que de acuerdo con sus características macroscópicas no se observaron diferencias considerables. Gómez *et al.* (2009) identificaron a *L. theobromae* como agente causal de pudrición de frutos de mamey en poscosecha, describen al hongo con micelio abundante, septado, ramificado y de gris oscuro a negro; los conidios inicialmente unicelulares hialinos, granulados, subovoides a elipsoides oblongos con pared delgada y base truncada; al madurar desarrollaron una pared gruesa y septada a la mitad, café oscuro y frecuentemente estriados longitudinalmente (Figura 2 C y D). Similarmente, Tovar-Pedraza *et al.* (2012) confirmaron a *L. theobromae* como el hongo causante de la muerte de varetas injertadas de mamey en Guerrero, México y mencionan que la colonia del hongo mostró crecimiento micelial a ero rápido y abundante, inicialmente gris, llegando a ser grisoliv ceo y más denso en el centro del disco, picnidios en estroma, simples o compuestos, dispersos y frecuentemente agregados, conidios inmaduros hialinos, elipsoidales a subovoides, conidios maduros café oscuro, elipsoidales a ovoides, y con estriaciones longitudinales irregulares.

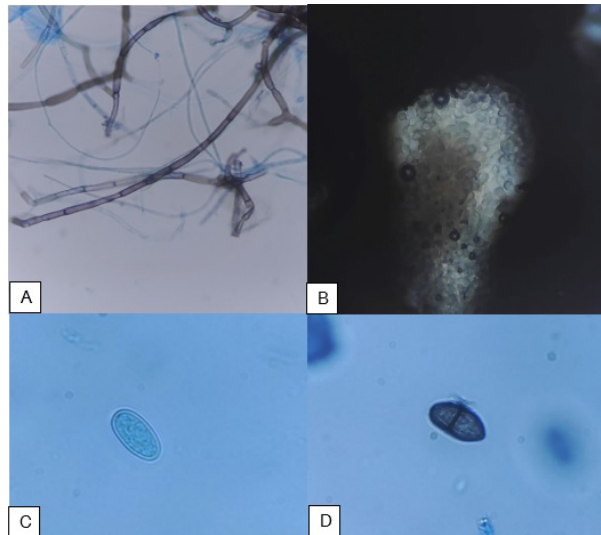


Figura 2. Caracteres microscópicos distintivos de *Lasiodiplodia*.

(A) Hifas septadas de a los 10 d de edad visto a 40X. (B) Conidios aglomerados que se desarrollan en células conidiógenas dentro del picnidio (10X). (C) Conidios jóvenes, hialinos y cenocíticos vistos a 40X. (D) Conidios maduros, oscuros y con un septo vistos a 40X.

Valle de la Paz *et al.* (2019) reportaron tres especies del género *Lasiodiplodia* (*L. theobromae*, *L. citricola* y *L. pseudotheobromae*), causando gomosis, muerte descendente de ramas y la muerte de árboles de lima 'Persa' en Morelos, México, observaron colonias con crecimiento micelial gris ahumado, luego gris olivo a gris verdoso y la presencia de picnidios a los 30 d de incubación. En los estados de Nuevo León y Tamaulipas, México, en naranjo dulce con síntomas de muerte regresiva se identificó a los hongos *L. theobromae*, *Fomitopsis meliae* y *Eutypella citricola* mediante caracteres culturales, morfológicos, moleculares y patogénicos. La colonia de *L. theobromae* mostró inicialmente una coloración blanquecina, volviéndose gris y oscureciendo al paso de los días, los conidios inicialmente de forma ovalada, hialinos y sin septos, pero al envejecer el cultivo llegaron a ser septados y adquirieron una coloración café (Polanco *et al.*, 2019). En Nayarit, Medina *et al.* (2018) reportaron a *L. theobromae* como agente causal de la pudrición blanda de frutos precosecha de yaca (*Artocarpus heterophyllus*), el hongo mostró un crecimiento uniforme y continuo, las colonias desarrollaron micelio abundante, algodonoso, de color blanco-grisáceo aéreo que se tornó gris oliváceo, después se tornó negro; a los 20 d se observaron conidiomas picnidiales.

Identificación molecular

Se obtuvieron 30 ng μL^{-1} de ADN de cada uno, con relaciones de absorbancia 260/280 entre 1.8 y 2. La amplificación del ADN extraído de los 9 aislamientos obtenidos, permitió la obtención de ampliaciones de 540 pb para las regiones ITS-4/ITS-5 y 300 pb para las regiones EF-728/EF-986 del ADNr. Se obtuvieron secuencias consenso de los productos de PCR con 530 y 290 pb. La amplificación de las regiones ADNr los aislamientos de *Lasiodiplodia* mostraron una variación de 99.4 a 100 % en las secuencias de la región ITS ADNr. Resultados similares obtuvo Al-Sadi et al. (2013) donde el rango fue de 99.4 a 100 %. Al ingresar las secuencias consenso de ADN en BLAST de los 9 aislamientos y compararlas con secuencias del GenBank, todas coincidieron con el género *Lasiodiplodia* (Tabla 2). Para el aislado patogénico, con los iniciadores EF1-728F y EF1-986R, la similitud de nucleótidos fue de 99.6 % con las secuencias de *L. theobromae*. El árbol filogenético (Figura 3) se construyó con las nueve secuencias obtenidas en el presente estudio; nueve secuencias de especies de *Lasiodiplodia* depositadas en el GenBank por otros autores y seleccionadas para propósitos comparativos por presentar altos niveles de identidad con nuestros aislados. El hongo *Rhizopus oryzae*, se utilizó como grupo externo de análisis y seleccionado por no estar filogenéticamente relacionados con *Lasiodiplodia*.

Los aislados obtenidos se presentan en 8 clados donde LP2 y LP3 se encuentran en el mismo clado y los demás, aunque cercanos se encuentran en clados diferentes, los aislados Ch2 y Go son bastante cercanos entre sí, pero se encuentran bastante retirados de los primeros seis y el más lejano que es Dv2 debido a que presenta menos similitudes con los demás aislados derivadas de una posible presión de selección. *Lasiodiplodia* es un patógeno poco estudiado respecto a su variabilidad genética, patogenicidad, virulencia y rango de hospederos en México. Lo anterior, reafirma la necesidad de conducir estudios que involucren caracteres morfológicos y moleculares o genéticos de *Lasiodiplodia*, especialmente por la posible asociación de un complejo de especies crípticas en frutales que están siendo afectados por *Lasiodiplodia* en Nayarit. Hoy en día la aplicación de herramientas moleculares, como los marcadores de ADN, permiten tener una mayor confiabilidad en los estudios evolutivos de las poblaciones de hongos fitopatógenos (Manzo et al., 2005). En otro estudio con 64 aislados se logró obtener tres clados, el primero con 25 aislamientos, el segundo con 11 aislamientos y el tercero con los 28 aislados restantes (Al-Sadi, et al., 2013). Similarmente Burgess et al. (2006), agruparon 45 aislados de *Lasiodiplodia* en cinco clados correspondientes a *L. theobromae*, *L. gonubiensis* y tres taxones no descritos denominados clado III, clado IV y clado V.

Tabla 2. Identidad molecular de aislados de *Lasiodiplodia* aislados de tejidos de guanábana con síntomas de muerte descendente en Nayarit, México.

Aislado	ITS	Tamaño bp	Identidad (%)	EF	Tamaño bp	Identidad (%)
To1	<i>L. iranensis</i>	530	99.81	L. jatrophicola	286	99.65
To2	<i>L. theobromae</i>	532	100	L. theobromae	290	99.65
Cha1	<i>L. theobromae</i>	529	100	L. theobromae	295	100
Cha2	<i>L. venezuelensis</i>	532	99.81	L. laosensis	289	99.65
Div	<i>L. theobromae</i>	538	99.81	L. theobromae	284	100
Go	<i>L. pseudotheobromae</i>	535	99.44	L. theobromae	289	100
LP1	<i>L. theobromae</i>	529	100	L. theobromae	285	100
LP2	<i>L. theobromae</i>	533	100	L. theobromae	282	100
LP3	<i>L. theobromae</i>	531	100	L. brasiliensis	260	99.59

EF=factor de elongación; bp=pares de bases

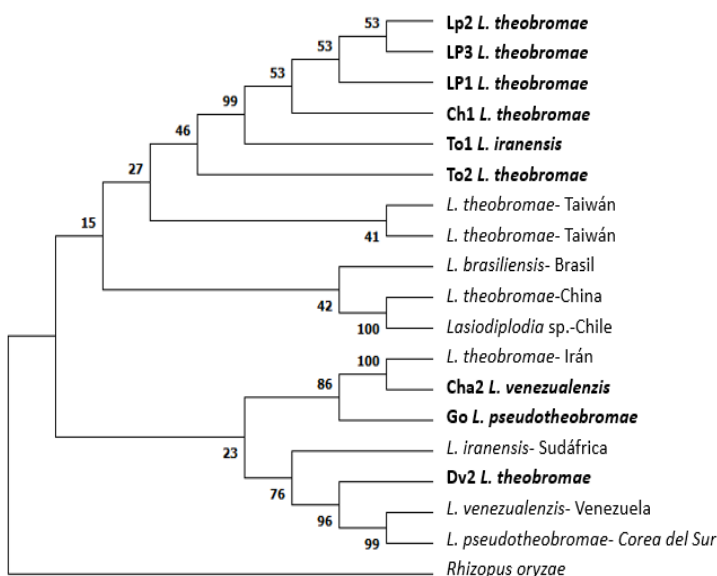


Figura 3. Árbol filogenético construido con secuencias ITS 4/5 del ADNr de aislamientos de *Lasiodiplodia* (resaltados en negritas) obtenidos de guanábana de Compostela y San Blas, Nayarit, México y de secuencias de referencia del GenBank.

Los valores de bootstrap se presentan en las ramas.

Conclusiones

Lasiodiplodia theobromae es el agente causal de muerte descendente de ramas en árboles de guanábana en Nayarit, México, induce marchitamiento de hojas y posterior muerte de la rama, así como lesiones necróticas en los ápices de las ramas a los 22 d posteriores a la inoculación. Se identificó a *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. venezuelensis* y *L. iranensis*, patógenos putativos en guanábana de Compostela y San Blas, Nayarit, México. Los aislados presentan características del género *Lasiodiplodia*, micelio aéreo abundante, hifas blancas y cenoc ticas cuando es joven y oscuras septadas a los 5 d, picnidios con conidios a los 30 d. Conidios ovoides a elipsoidales, con ápices redondeados, hialinos y cenocíticos en los cultivos jóvenes, tornándose a café oscuro al envejecer, con un septo, los cuales muestran estrías longitudinales.

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, autor 1, autor 2.; desarrollo de la metodología, autor 1, autor 2.; manejo de software, autor 1, autor 4.; validación experimental, autor 2, autor 3, autor 4.; análisis de resultados, autor 2, autor 3, autor 4.; Manejo de datos, autor 1, autor 4.; escritura y preparación del manuscrito, autor 1, autor 2, autor 3, autor 4, autor 5, autor 6.; redacción, revisión y edición, autor 1, autor 2, autor 3, autor 4, autor 5, autor 6.; administrador de proyectos, autor 1, autor 2.; adquisición de fondos, autor 2.

Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada con fondos propios.

Agradecimientos

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para estudios de posgrado, al Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit. Al Laboratorio de Parasitología Agrícola del Cemic 03 y al Laboratorio de Biotecnología por facilitar sus espacios y equipos para el desarrollo de esta investigación.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias

- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Mohammadi-Goltapeh, E., Zare, R., & Phillips, A. J. L. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia*, 25, 1-10. <https://doi.org/10.3767/003158510X524150>
- Allers, T., & Lichten, M. (2000). A method for preparing genomic DNA that restrains branch migration of Holliday junctions. *Nucleic acids research*, 28 (2), e6. <https://doi.org/10.1093/nar/28.2.e6>
- Al-Sadi, A. M., Al-Wehaibi, A. N., Al-Shariqi, R. M., Al-Hammadi, M. S., Al-Hosni, I. A., Al-Mahmooli, I. H., & Al-Ghaithi, A. G. (2013). Population genetic analysis reveals diversity in *Lasiodiplodia* species infecting date palm, citrus, and mango in Oman and the UAE. *Plant Disease*, 97, 1363-1369. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0245-RE>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215 (3), 403-10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alves, A., Crous, P. W., Correia, A., & Phillips, A. J. L. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*, 28, 1-13. https://www.researchgate.net/publication/40095352_Morphological_and_molecular_data_reveal_cryptic_species_in_Lasiodiplodia_theobromae
- Burgess, T. I., Barber, P. A., Mohali, S., Pegg, G. de Beer, W., & Wingfield, M. J. (2006). Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia*, 98 (3), 423-435. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832677>
- Camero-Ayón, C. B., Luna-Esquivel, G., Rios-Velasco, C., Díaz-Heredia, M., Rodríguez-Palomera, M., Betancourt-Aranguré, A., & Camero-Campos, O. J. (2019). Causal agents of rot in Soursop fruit (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. *Revista BioCiencias*, 6, e538. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e538>
- Casarrubias-Carrillo, U., González-Chavira, M. M., Cruz-Hernández, A., Cárdenas-Soriano, E., Nieto-Ángel, D., & Guevara-González, R. G. (2003). Variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. aislado de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) mediante el uso de marcadores moleculares RAPDS. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (3), 338-345. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221315>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791. <https://doi.org/10.2307/2408678>
- Fischer, I. H., Perdoná, M. J., Cruz, J. C. S., & Firmino, A. C. (2017). First report of *Lasiodiplodia theobromae* on *Macadamia integrifolia* in Brazil. *Summa Phytopathologica*, 43 (1), 70. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/169154>
- Gómez, J. R., Nieto, Á. D., Téliz, O. D., Mora, A. J. A., Martínez, D. M. T., & Vargas, H. M. (2009). Evaluación de la calidad e incidencia de hongos en frutos refrigerados de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn. *Agrociencia*, 43 (1), 37-48. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952009000100005&lng=es&tlng=es
- Gonçalves, F. J. T., Freire, F. das C. O., Lima, J. S., Melo, J. G. M., & Câmara, M. P. S. (2016).

- Patogenicidad de especies de Botryosphaeriaceae endofíticas en plantas de la Caatinga del Estado de Ceará en mango y *Spondias* sp. *Summa Phytopathologica*, 42 (1), 43-52. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2099>
- Hernández, F. L. M., Gómez J. R., & Andrés A. J. (2013). Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Libro Técnico Núm. 1. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit, México, p.87. Disponible en <https://docplayer.es/7541820-Importancia-plagas-insectiles-y-enfermedades-fungosas-del-cultivo-del-guanabano.html>
- Hernández-Fuentes, L. M., Gómez-Jaimes, R., López-Martínez V., & Castañeda-Vildozola Á. (2018). Xylophagous insects associated with soursop (*Annona muricata* L.) branches, affected by *Lasiodiplodia theobromae* Pat. Southwestern *Entomologist*, 43 (2), 543-546. <http://www.bioone.org/doi/full/10.3958/059.043.0228>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Leon, T. B., & Mattos, C. L. (2016). Hongos fitopatógenos asociados a semillas de palto (*Persea americana* Mill.). *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 18 (4), 423-430. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2016.216>
- Manzo, S. G., Canto, C. B., & James, K. A. (2005). Hongos patógenos: enemigos versátiles. *Revista Ciencia*, 53 (3), 71-75. https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/56_3/hongos.pdf
- Medina, T. M. A., Luna, E. G., Cambero, C. O. J., Ramírez, G. L. G., & Rios, V. C. (2018). *Lasiodiplodia theobromae* agente causal de la pudrición blanda de frutos de *Artocarpus heterophyllus* Lam. en Nayarit, México. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40 (5), e-018. <https://doi.org/10.1590/0100-29452018018>
- Nam, M. H., Park, M. S., Kim, H. S., Kim, T. I., Lee, E. M., Park, J. D., & Kim, H.G. (2016). First Report of Dieback Caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Strawberry Plants in Korea. *Mycobiology*, 44(4), 319-324. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2016.44.4.319>
- Picos-Muñoz, P. A., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., & Allende-Molar, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33 (1): 54-74. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000100054&lng=es&tlng=es.
- Polanco, F. L. G., Alvarado, G. O. G., Pérez, G. O., González, G. R., & Olivares, S. E. (2019). Hongos asociados con la muerte regresiva de los cítricos en Nuevo León y Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10 (4), 757-764. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1417>
- Punithalingam, E. (1980). Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae*. Vaduz, Cramer.
- Saldarriaga, C. A., Castaño, Z. J., & Arango, I. R. (2008). Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Bogotá*, 22 (123), 145-156. https://www.researchgate.net/publication/257652278_Caracterizacion_del_Agente_Causal_de_la_Antracnosis_en_Tomate_de_Arbol_Manzano_y_Mora

- Sandoval-Sánchez, M., Nieto-Ángel, D., Sandoval-Islas, J. S., Téliz-Ortiz, D., Orozco-Santos, M., & Silva-Rojas, H. V. (2013). Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia*, 47 (1), 61-73. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30225619006>
- Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera (SIAP). (2023). Cierre de la producción agrícola por cultivo. En línea. Consultado el 11 de febrero de 2023 en <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Shah, M. D., Verma, K. S., Singh K., & Kaur, R. (2010). Morphological, pathological and molecular variability in *Botryodiplodia theobromae* (Botryosphaeriaceae) isolates associated with dieback and bark canker of pear trees in Punjab, India. *Genetics and Molecular Research*, 9 (2), 1217-1228. <https://doi.org/10.4238/vol9-2gmr812>
- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 101, 11030-11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.04042061>
- Tovar, P. J., Mora, A. J., Nava, D. C., Téliz, O. D., Villegas, M. Á., & Leyva, M. S. (2013). Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn] grafts in México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36 (3): 233-238. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000300007
- Tovar-Pedraza, J. M., Mora-Aguilera, J. A., Nava-Díaz, C., Téliz-Ortiz, D., Valdovinos-Ponce, G., Villegas-Monter, Á., & Hernández-Morales, J. (2012). Identification, pathogenicity, and histopathology of *Lasiodiplodia theobromae* on mamey sapote grafts in Guerrero, México. *Agrociencia*, 46 (2), 147-161. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30223121005>
- Úrbez-Torres, J. R., & Gubler, W. D. (2009). Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 93 (9), 584-592. <https://doi.org/10.1094/pdis-93-6-0584>
- Valle de la Paz, M., Guillén-Sánchez, D., Gijón-Hernández, A. R., Alía-Tejacal, I., López-Martínez, V., Juárez-López, P., Martínez-Fernández, E., Hernández- Arenas, M., & Ariza-Flores, R. (2019). Species of *Lasiodiplodia* in lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka) in Morelos, México. *Revista Bio Ciencias*, 6, e595. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e595>
- Vásquez-López, A., Mora-Aguilera, J. A., Cárdenas-Soriano, E., & Téliz-Ortiz, D. (2009). Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore y Stearn) en el estado de Guerrero, México. *Agrociencia*, 43 (7), 717-728. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952009000700006
- White, T. J., Bruns, T. Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En Press, A. (Ed.), PCR protocols: A guide to methods and applications. p.315-322. https://www.researchgate.net/publication/262687766_Amplification_and_Direct_Sequencing_of_Fungal_Ribosomal_RNA_Genes_for_Phylogenetics